白藜芦醇与紫檀芪抗氧化活性差异的电化学研究

余沐洋，张 萌，高凌峰，何建波*
(合肥工业大学化工学院，农产品生物化工教育部工程研究中心，安徽 合肥 230009)

摘 要：为揭示白藜芦醇(反式)与其衍生物紫檀芪的抗氧化活性差异的内在原因，对两种物质的氧化机理进行研究。采用循环伏安法考察 pH 值、富集时间对氧化过程的影响，采用薄层长光程紫外 - 可见光谱电化学方法原位监测氧化产物的形成。结果表明：紫檀芪在油性碳糊电极表面上的吸附富集作用远强于白藜芦醇；两者的初始氧化都发生在对位羟基上，通过一电子一质子传递步骤生成苯氧自由基中间体；紫檀芪自由基中间体易于耦合迅速转化为二聚体产物，而白藜芦醇自由基在碱性介质中需经历较难进行的中间双键断裂途径，转化为可溶性小分子产物。紫檀芪较强的亲脂性引起的富集作用以及氧化中间体的快速二聚化，是其具有较强抗氧化活性的重要原因。
关键词：抗氧化活性；白藜芦醇；紫檀芪；循环伏安法；原位光谱电化学

An Electrochemical Study of the Difference in Antioxidant Activity between Resveratrol and Pterostilbene

YU Mu-yang，ZHANG Meng，GAO Ling-feng，HE Jian-bo*
(Engineering Research Centre of Bio-process, Ministry of Education, School of Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The oxidation mechanisms of *trans*-resveratrol and its derivative pterostilbene were studied to better understand the difference in antioxidant activity between the stilbene compounds. The effects of pH and accumulation time were examined by cyclic voltammetry, and the formation of oxidation products was *in situ* by thin layer UV-Vis spectroelectrochemistry. It was observed that adsorptive accumulation of pterostilbene on the oleaginous surface of the carbon paste working electrode was much stronger than that of resveratrol. The initial oxidation of both the stilbenes occurred at the *p*-hydroxyl group *via* one electron one proton transfer, forming phenoxy free radicals. The radical intermediates of pterostilbene might couple immediately to yield dimers at the electrode surface, while those of resveratrol, especially in the alkaline media, had to undergo the oxidative cleavage of the center double bond to produce soluble small molecules. Lipophilicity of pterostilbene superior to resveratrol might be the important reason for its higher antioxidant activity, since lipophilicity increases the adsorptive accumulation as well as accelerates the dimerization of the oxidized radical intermediates.
Key words: antioxidant activity; resveratrol; pterostilbene; cyclic voltammetry; *in situ* spectroelectrochemistry
中图分类号：Q505 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2012)05-0078-05

白藜芦醇(3,4′,5- 三羟基 -1,2 二苯乙烯)广泛存在于葡萄、花生、虎杖、藜芦、决明等许多植物中，并且在葡萄酒中含量丰富[1]，具有预防心脑血管疾病、防癌、抗炎、抗氧化、抗病原微生物等多种生理保健作用[1-2]。作为一种天然的非黄酮类多酚化合物，白藜芦醇具有良好的抗氧化和自由基清除作用，可用于医药和食品工业[3]。紫檀芪是白藜芦醇的 3,5 位两个酚羟基被甲氧基取代的衍生物，主要存在于葡萄、蓝莓和西红柿等浆果中，近年来由于其潜在的抗癌、抗氧化、抗炎、抗糖尿病等功效而备受关注[4-6]。虽然羟基的数量及位置通常是决定天然多酚产物生物活性的主要因素，但仅保留有 4′位羟基的紫檀芪却能表现出与白藜芦醇相当甚至

收稿日期：2011-05-10
基金项目：国家自然科学基金项目(20972038)
作者简介：余沐洋(1986—)，女，硕士研究生，研究方向为天然产物电化学。E-mail：yumuyang415@163.com
* 通信作者：何建波(1965—)，男，教授，博士，研究方向为有机与分析电化学。E-mail：jbhe@hfut.edu.cn

更强的抗氧化活性[6-8]。在无细胞系统中紫檀芪具有与白藜芦醇相似的抗氧化能力[6]。在保护红细胞膜免受脂质过氧化方面，紫檀芪作用显著(IC_{50}＝(44.5 ± 7.8)μmol/L)，而白藜芦醇的功效却明显较小[7]。据最近的报道，在预防氧化偶氮甲烷诱发的结肠癌方面，紫檀芪也比白藜芦醇更有效，其作用机制是通过激活 NF-E2 相关因子 2 调控的抗氧化信号转导途径[8]。

针对白藜芦醇和紫檀芪的抗氧化活性与羟基数目负相关的内在原因，本实验试图从电化学角度进行一些解释。电化学伏安法的氧化峰电势、氧化峰电流等参数，已被用于抗氧化活性的评价指标[9-11]。近年来对一系列天然黄酮类化合物的抗氧化机制进行了电化学研究[12-14]，从电氧化反应机理探讨抗氧化活性。实验中选用石墨 - 固态石蜡碳糊电极作为工作电极，石蜡使电极表面具有较好的油脂性及生物相容性。迄今对白藜芦醇的电化学研究已有一些报道，包括白藜芦醇的伏安行为及电氧化机理[15]、电化学分析[16]和与 DNA 的相互作用[17]等，而对紫檀芪尚未见电化学研究的报道。本实验采用循环伏安法考察 pH 值、富集时间等对紫檀芪氧化过程的影响，薄层长光程紫外 - 可见光谱电化学监测氧化产物的形成，以深入研究其氧化机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白藜芦醇和紫檀芪(纯度 99%) 杭州广林生物医药有限公司。

石墨粉(光谱纯) 国药集团化学试剂有限公司；其他试剂均为分析纯；实验用水为二次蒸馏水。

1.2 仪器与设备

CHI600B 电化学工作站 上海辰华仪器公司；UV-Vis-2500 型紫外 - 可见分光光度计 日本岛津公司。

在自制的直径 3mm 石墨 - 石蜡碳糊电极[18]上进行循环伏安测试，在 7mm × 9mm 的方形碳糊电极上进行光谱电化学测试。辅助电极为铂电极，参比电极为 $Ag/AgCl/KCl_{sat}$ 电极。采用普通的 10mm 光程的石英光度池自制薄层长光程光谱电化学池[18]，薄层腔厚度 0.2mm。

1.3 电解液的配制

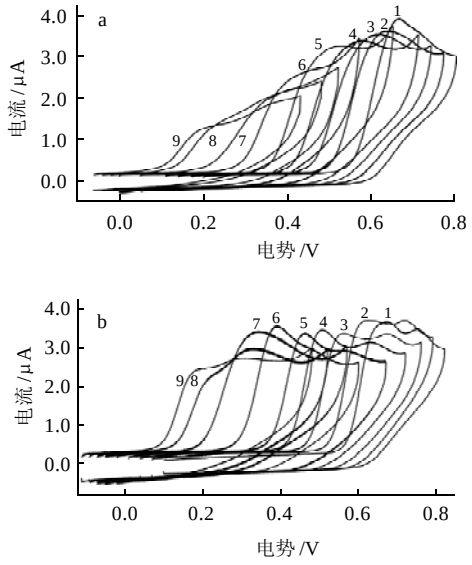
用乙醇为溶剂分别配制浓度 1.0mmol/L 白藜芦醇和紫檀芪的储备液，置于 4℃冰箱保存。以体积比 20:80 的乙醇和水为混合溶剂配制不同 pH 值的 0.2mol/L B-R 缓冲液(另含 0.5mol/L KCl)，pH 值梯度为 1.8、2.8、3.8、4.8、6.0、7.4、8.5、9.5 和 10.5。测定前取 90mL 缓冲液稀释 10mL 储备液，得到 0.1mmol/L 的电解液。除自然氧化实验外，电解液在使用前通高纯氮气 15min 除氧。

1.4 测试方法

在常规电解池中进行循环伏安(CV)测量，分别考察电解液 pH 值、富集时间、富集电势、扫描速率等对 CV 的影响。在薄层电解池中进行动态 UV-Vis 光谱测试，在恒电势氧化过程中，在 500～200nm 波长范围内反复快速扫描，采样间隔 1nm，每 20s 记录一条谱线，持续至谱线变化基本稳定(电解前亦记录一条谱线)。扫速速率为 100mV/s，扫描前在起始电势下富集 60s。自然氧化在普通石英光度池中进行，因反应速率慢，每 1800s 记录一条谱线。实验在室温下进行。使用过的碳糊电极在 0.1mol/L $NaHCO_3$ 溶液中 0～1.6V 电势范围内清洗扫描 30 圈。

2 结果与分析

2.1 pH 值对白藜芦醇和紫檀芪的初始氧化峰的影响



1～9.pH 值分别为 1.8、2.8、3.8、4.8、6.0、7.4、8.5、9.5 和 10.5。

图 1 不同 pH 值条件下白藜芦醇(a)和紫檀芪(b)的循环伏安图

Fig.1 Cyclic voltammograms of resveratrol (a) and pterostilbene (b) at different pH values

多酚化合物的抗氧化活性主要取决于分子中最易被氧化的羟基，对应于循环伏安曲线上的第一个氧化峰[9]。由图 1 可知，随着 pH 值由酸性变化到碱性，白藜芦醇的第一氧化峰峰形变差且峰电流(i_p)明显减小(图 1a)；紫檀芪的氧化峰电流变化不显著，但可分辨出相距很近的两个重叠峰(图 1b)，表明包括两个串联的失电子步骤。

由图 2 可知，白藜芦醇的峰电势(E_p)随 pH 值增大而负移但线性关系差：E_p/V＝0.812－0.056 pH(r＝－0.978)，斜率为 56mV，表明起始氧化步骤有等数量的电子和质子参与。紫檀芪第一氧化峰的峰电势与 pH 值之间有良

好的线性关系 E_p/V = 0.775 − 0.054 pH(r = − 0.995)，斜率为 54mV，再考虑到仅在 4′ 位上有一个羟基，推断在该位置发生了一电子一质子氧化反应，生成了苯氧自由基中间体，反应方程如式(1)所示。4′ 位羟基的电化学活性受另一苯环上取代基的影响应很小，而实测的白藜芦醇第一氧化峰电势与紫檀芪的相差不大，因此也应是 4′ 位羟基的氧化。这个对位羟基的 pK_a 值(pK_{a1} = 8.8)小于其他两个间位羟基(pK_{a2} = 9.8，pK_{a3} = 11.4)，许多研究已发现白藜芦醇 4′位羟基对其在细胞遗传学、清除自由基、抗氧化和抗增殖等方面的活性是十分重要的[19]。峰电流和峰电势两方面数据都表明，白藜芦醇的氧化途径受 pH 值影响比紫檀芪复杂。对两种物质都没有观察到对应的还原峰，表明电氧化过程都是不可逆的。

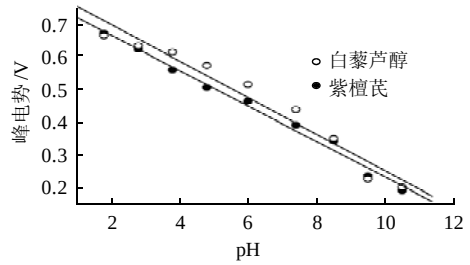
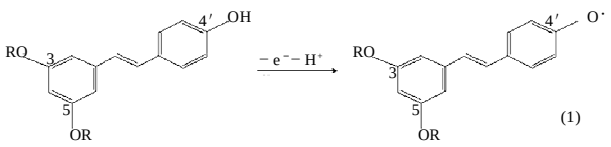


图 2 白藜芦醇和紫檀芪的第一氧化峰的峰电势与 pH 值的关系

Fig.2 Effects of pH on peak potentials for initial oxidation of resveratrol and pterostilbene



R=H.白藜芦醇；R=CH_3.紫檀芪。

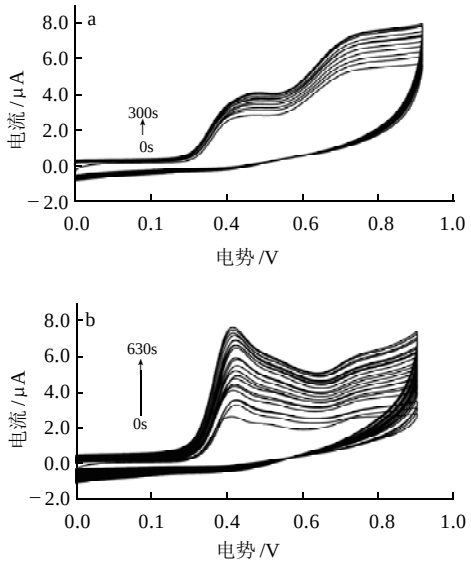
式(1)中的苯氧自由基可发生异构化，与 3′位碳自由基和中心双键上的碳自由基共存[20]，并将继续转化为没有电还原活性的稳定产物。后面将结合原位光谱电化学数据进一步讨论。

图 1 中的氧化峰电势和氧化峰电流可反映抗氧化活性的强弱[9-11]。以生理 pH7.4 为例，紫檀芪和白藜芦醇的峰电势分别为 0.39V 和 0.44V，峰电流分别为 3.57μA 和 2.64μA，都表明紫檀芪的抗氧化活性强于白藜芦醇。可见从电化学参数分析两者抗氧化性的相对强弱与文献报道的结果[7-8]相符。

2.2 富集时间对白藜芦醇和紫檀芪氧化峰的影响

在不同富集时间后记录白藜芦醇和紫檀芪的 CV 曲线，分别示于图 3。反应物浓度均为 0.1mmol/L，支持电解液为 0.2mol/L B-R 缓冲液(pH7.4) + 0.5mol/L KCl，扫速速率为 100mV/s。将第一氧化峰的峰电流对富集时间作图，得到图 4。可以看出，峰电流随着富集时间延长而增大，其中紫檀芪的峰电流增大幅度显著大于白藜芦醇；白藜芦醇的峰电流在富集 300s 之前已基本达到稳定，而紫檀芪的峰电流在富集 600s 之后仍在增大。这表明两个间位羟基被甲氧基取代使紫檀芪的亲脂性增强，从而在石蜡碳糊电极表面发生更强的吸附。可见，紫檀芪较强的亲脂性使其具有较高的生物利用度，促进了抗氧化活性；而白藜芦醇的生物利用度较低[1]也可能与其亲脂性较弱有关。已有研究者推测亲脂性较强是紫檀芪具有较高生物活性的可能原因[21]。

另一方面，富集电势的正移使两种反应物的氧化峰电流有所增大，但影响较小。此外，在 2～800mV/s 的扫速范围内获得了峰电流与扫速一次方的正比关系，也证明了两种反应物在电极表面的吸附。



箭头所指为富集时间延长方向，富集电势设为 0V。

图 3 不同富集时间后白藜芦醇(a)和紫檀芪(b)的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of resveratrol (a) and pterostilbene (b) after different accumulation time

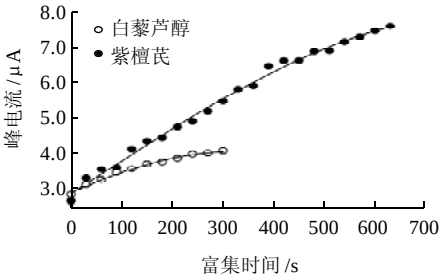


图 4 白藜芦醇和紫檀芪的第一氧化峰的峰电流与富集时间的关系

Fig.4 Effects of accumulation time on peak currents for initial oxidation of resveratrol and pterostilbene

2.3 碱性介质中氧化过程的原位 UV-Vis 光谱

碱性介质中两种物质在空气中就可自然氧化，便于与电氧化比较；碱液中两者抗氧化活性差别也更大(图 1

峰电流)。图5分别是1.0mmol/L白藜芦醇(pH9.5)电氧化和自然氧化的原位薄层UV-Vis光谱变化，其中电氧化在恒电势0.35V条件下进行。图5中两图呈现出一致的光谱变化趋势，可见电氧化和自然氧化生成了相同的氧化产物，主要差异在于电氧化的速率约为自然氧化的100倍。氧化前，白藜芦醇分别在215nm和312nm波长处呈现两个特征吸收峰Ⅰ和Ⅱ(图5中第一条谱线)，后者对应于由中心双键相连的整个分子的π-π共轭。当施加氧化电势后，光谱的变化在238、278nm和365nm波长处形成3个等吸点，表明可溶性产物的生成；312nm吸收峰Ⅱ显著减弱至峰形趋于消失，表明共轭链在产物分子中被缩短，中心双键或已断裂；吸收峰Ⅰ仅有少量减弱，同时在250nm附近产生一新吸收峰Ⅲ，表明苯环结构仍然存在。

Pezet等[22]报道了白藜芦醇在过氧化物酶作用下生成两种氧化二聚体ε-/δ-葡萄素。Camont等[23]近期报道了白藜芦醇在水溶液中被·OH氧化的4种产物，为云杉鞣酚(在白藜芦醇的3′位上增加了一个羟基)、3,5-二羟基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲醛和4-羟基苯甲醛。无论是葡萄素还是云杉鞣酚，分子中共轭链没有缩短，与吸收峰Ⅱ的消失不符。后3种苯甲酸(或醛)衍生物是白藜芦醇中心双键氧化断裂而生成的，而苯甲酸(或醛)的特征吸收峰与图5中吸收峰Ⅰ和Ⅲ相近，如3,5-二羟基苯甲酸在水溶液中最大波长吸收峰在243nm[24]。

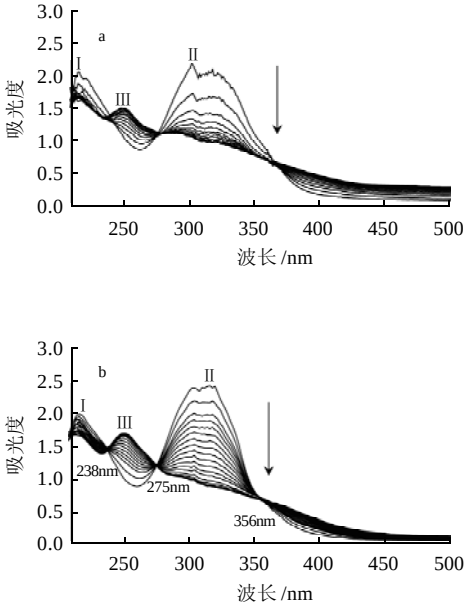


图5 白藜芦醇电氧化(a)和自然氧化(b)的原位薄层UV-Vis光谱
Fig.5 *in situ* UV-Vis spectra during electro-oxidation (a) and natural oxidation (b) of resveratrol

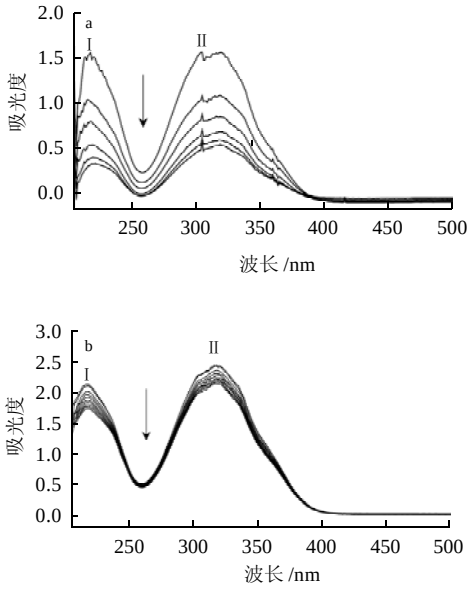


图6 紫檀芪电氧化(a)和自然氧化(b)的原位薄层UV-Vis光谱
Fig.6 *in situ* UV-Vis spectra during electro-oxidation (a) and natural oxidation (b) of resveratrol

图6分别给出了紫檀芪电氧化和自然氧化的光谱变化图，实验条件参数与上述白藜芦醇的完全一致。看出紫檀芪的电氧化和自然氧化的光谱变化趋势也相同，自然氧化比白藜芦醇慢得多。氧化前，紫檀芪分别在217nm和312nm波长处呈现两个特征吸收峰Ⅰ和Ⅱ。当施加氧化电势后，两个吸收峰显示几乎同步的减弱，未形成等吸收点，表明没有可溶性的吸光物质生成，而是在电极表面上生成了沉积物，其亲脂性比紫檀芪更强。这使得电极表面被钝化，阻碍了薄层腔中反应物的耗竭性电解，两个特征吸收峰不能达至消失。最近Rodríguez-Bonilla等[20]首次报道了紫檀芪在过氧化物酶作用下的氧化产物及反应机理，提出式(1)中的苯氧自由基具有3种同分异构体，两两之间发生自由基-自由基耦合反应，生成脱氢二聚体(顺式和反式)和开式二聚体，它们都具有显著的疏水性。经自由基耦合步骤后，所得到的3种二聚体分子中都有一个4′位羟基得到再生而可再次被电化学氧化，这可解释紫檀芪的初步氧化呈现两个相距很近的氧化电流峰(图1b)。

由上可知，在碱液中白藜芦醇通过中心双键断裂生成了水溶性小分子产物，而紫檀芪则通过自由基偶合在电极表面生成不溶性二聚体。这种产物形态的差异得到了交流阻抗法实验的证实，并可能与两者的亲脂性有关：紫檀芪的亲脂性较强，初始氧化生成的自由基集中在油性碳糊电极表面上，便于自由基两两结合而快速转化为二聚体产物，而白藜芦醇的自由基则需经历较难进行的中间双键断裂途径。自由基中间体转化得越快，越能拉动式(1)所示的氧化步骤，从而增强抗氧化活性。

随着pH值降低，白藜芦醇羟基电离度减小，亲脂性得到增强，抗氧化性也随之增强(图1a峰电流)。此外，当采用不具油脂性的铂电极时，测得的CV氧化电流密度比碳糊电极上小得多，电流峰形也很差。在石英光度池中进行自然氧化时，反应物的亲脂性不能发挥作用，此时紫檀芪的氧化速率反比白藜芦醇慢得多(比较图5b和图6b)。

3 结 论

本实验揭示了紫檀芪在油脂性表面上的吸附富集作用远强于白藜芦醇，并导致两者抗氧化活性的差异。两者的初始氧化都发生对位羟基上，通过一电子一质子传递反应生成苯氧自由基中间体。紫檀芪由于良好的亲脂性，其自由基中间体易于两两耦合生成二聚体产物；而白藜芦醇亲脂性较差，特别是在碱液中，其自由基中间体需经历较难进行的中间双键断裂途径，转化为可溶性小分子。氧化中间体快速转化有利于增强抗氧化活性。紫檀芪较强的亲脂性引起的富集作用以及氧化中间体的快速二聚化，是其具有较强抗氧化活性的重要原因。

参考文献：

[1] GUERRERO R F, GARCIA-PARRILLA M C, PUERTAS B, et al. Wine, resveratrol and health: a review[J]. Nat Prod Commun, 2009, 4 (5): 635-658.

[2] DELMAS D, AIRES V, LIMAGNE E, et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol[J]. Ann NY Acad Sci, 2011, 1215(1): 48-59.

[3] GULCIN I. Antioxidant properties of resveratrol: a structure-activity insight[J]. Innovat Food Sci Emer Tech, 2010, 11(1): 210-218.

[4] RIMANDO A M, CUENDET M, DESMARCHELIER C, et al. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(12): 3453-3457.

[5] REMSBERG C M, YANEZ J A, OHGAMI Y, et al. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity[J]. Phytother Res, 2008, 22(2): 169-179.

[6] PERECKO T, DRABIKOVA K, RACKOVA L, et al. Molecular targets of the natural antioxidant pterostilbene: effect on protein kinase C, caspase-3 and apoptosis in human neutrophils *in vitro*[J]. Neuroendocrinol Lett, 2010, 31: 84-90.

[7] MIKSTACKA R, RIMANDO A M, IGNATOWICZ E. Antioxidant effect of *trans*-resveratrol, pterostilbene, quercetin and their combinations in human erythrocytes *in vitro*[J]. Plant Food Hum Nutr, 2010, 65 (1): 57-63.

[8] CHIOU Y S, TSAI M L, NAGABHUSHANAM K, et al. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(6): 2725-2733.

[9] YANG Bin, KOTANI A, ARAI K, et al. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials[J]. Anal Sci, 2001, 17(5): 599-604.

[10] MAGALH ES L M, SEGUNDO M A, REIS S, et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties[J]. Anal Chim Acta, 2008, 613(1): 1-19.

[11] ZETTERSTEN C, CO M, WENDE S, et al. Identification and characterization of polyphenolic antioxidants using on-line liquid chromatography, electrochemistry, and electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2009, 81(21): 8968-8977.

[12] 何建波, 独家启, 袁圣杰, 等. 木犀草素与槲皮素抗氧化性能差异的电化学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 37-40.

[13] 徐欣荣, 何建波, 程萍. 黄酮醇抗氧化剂构效关系的电化学研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 6-9.

[14] HE Jianbo, YUAN Shengjie, DU Jiaqi, et al. Voltammetric and spectral characterization of two flavonols for assay-dependent antioxidant capacity [J]. Bioelectrochemistry, 2009, 75(2): 110-116.

[15] CORDUNEANU O, JANEIRO P, BRETT A M O. On the electrochemical oxidation of resveratrol[J]. Electroanalysis, 2006, 18(8): 757-762.

[16] AIRADO-RODRIGUEZ D, GALEANO-DIAZ T, DURAN-MERAS I. Determination of trans-resveratrol in red wine by adsorptive stripping square-wave voltammetry with medium exchange[J]. Food Chem, 2010, 122(4): 1320-1326.

[17] CHEN Guifang, ZHAO Jing, LIU Xinjian, et al. Electrochemical sensing DNA damage with nano-titanium dioxide and repair with a medicinal herb species resveratrol[J]. J Biotechnol, 2007, 127(4): 653-656.

[18] HE Jianbo, WANG Yan, DENG Ning, et al. Study of the adsorption and oxidation of antioxidant rutin by cyclic voltammetry-voltabsorptometry [J]. Bioelectrochemistry, 2007, 71(2): 157-163.

[19] LÓPEZ-NICOLÁS J M, GARCÍA-CARMONA F. Aggregation state and pK_a values of (*E*)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(17): 7600-7605.

[20] RODRTÍGUEZ-BONILLA P, MENDEZ-CAZORLA L, LOPEZ-NICOLAS J M, et al. Kinetic mechanism and product characterization of the enzymatic peroxidation of pterostilbene as model of the detoxification process of stilbene-type phytoalexins[J]. Phytochemistry, 2011, 72 (1): 100-108.

[21] CICHOCKI M, PALUSZCZAK J, SZAEFER H, et al. Pterostilbene is equally potent as resveratrol in inhibiting 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate activated NF kappa B, AP-1, COX-2, and iNOS in mouse epidermis[J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(Suppl 1): 62-70.

[22] PEZET R, GINDRO K, VIRET O, et al. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 2004, 65(6): 297-303.

[23] CAMONT L, COLLIN F, MARCHETTI C, et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric identification of the oxidation end-products of trans-resveratrol in aqueous solutions[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(5): 634-642.

[24] KALINOWSKA M, SWISLOCKA R, BORAWSKA A, et al. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV) and microbiological studies of di-substituted benzoates of alkali metals[J]. Spectrochim Acta A, 2008, 70(1): 126-135.